

# Evaluación de la acción Citotóxica del extracto Metanólico de *Notholaena nivea* "CUTI- CUTI"

Castañeda, B.<sup>1</sup>; Castro de la Mata, R.<sup>1</sup>; Manrique, R.<sup>1</sup>; Ibáñez, L.<sup>1</sup>

## Resumen

**N**otholaena nivea, es una planta endémica utilizada en medicina tradicional como antidiabética. Pertenece a la familia Polypodiaceae y a la subfamilia Gymnogrammoide. Estudiamos la citotoxicidad con MTT, 3-(4,5)- dimethyl Thiazol-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, de acuerdo a la técnica de Mosmann, y la Actividad Antimitótica en el Modelo de Ciclo Celular de *Allium cepa*. Nuestros resultados muestran daños celulares a nivel mitocondrial, e inhibición del crecimiento de células viables del 70.71%, a una concentración de 100uM; así como un retardo en el desarrollo del ciclo celular de *Allium cepa*, estadísticamente significativo. En el ensayo de óxido nítrico se observó una inhibición de 14.86%.

**Palabras Claves:** *Notholaena nivea*, MTT, 3-(4,5)- dimethyl Thiazol-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, citotoxicidad, Cuti-Cuti, *Allium cepa*.

## Abstract

*Notholaena nivea*, is an endemic plant used in the traditional medicine, for the treatment of the diabetes, belonging to the Polypodiaceae family. We evaluated the cytotoxic activity

---

<sup>1</sup> Investigadores del Instituto de Investigación de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres. Lima - Perú.

using MTT (3-(4,5)-dimethyl Thiazol-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) according to the Mosmann technic, and the antimitotic action on the *Allium cepa* cellular cycle.

Our results indicate cellular lesions on mitochondria, and grow inhibition of viable cells, in 70.71 % at 100uM concentration. Otherwise, we found cytotoxic action supported by the delay of cell cycle in *Allium cepa*. The results were statistically different. With the nitric oxide assay we found 14.86 % of inhibition.

**Key words:** *Notholaena nivea*, MTT (3-(4,5)-dimethyl Thiazol-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), cytotoxicity, Cuti-Cuti, *Allium cepa*.

## INTRODUCCION

*La Notholaena nivea*, es un helecho propio del altiplano, las montañas y los valles semiáridos del este y Oeste de la Cordillera andina. Pertenece a la familia Polypodiaceae y a la subfamilia Gymnogrammoidey crece en las laderas de la colina y grietas de roca entre 500 y 4000 msnm. En el Perú, se encuentra desde el sur del departamento de La Libertad hasta Puno y Arequipa y su distribución continental alcanza desde el sur del Ecuador hasta el oeste de Argentina. La planta se caracteriza por tener un tallo corto, erecto, seco y delgado con escamas lineales y una altura entre 10-30 cm; las hojas son monomórficas: el peciolo más corto que la lámina, la cual es lanceolada u ovalada. La superficie abaxial está cubierta de un polvo blanco producto de la secreción. El esporangio nace en el terminal, a 1/4 -1/2 de una vena, de esporas globosas, usualmente rugosas y con granulaciones en su superficie. Este helecho es conocido en nuestro país con el nombre de Cuti-Cuti, como Kutu-Kutu, entre la población de habla quechua, o también como Chhaxella entre la de habla Aymara (Perú – Bolivia). Para el género *Notholaena*, se han descrito 42 especies, distribuidas en el continente sudamericano, con variedades: *nivea*, *oblóngata*, *tenera*, *flava*. *La Notholaena nivea*, es conocida, en el Perú, con los nombres de: Cuti Cuti, Doradilla, Raqui Raqui, y es utilizada por la población, en forma de infusión, para la diabetes y como vermífugo<sup>4,12</sup>.

Las plantas medicinales han sido empleadas, desde la antigüedad, por el hombre. Esta práctica es de gran importancia, ya que amplía el arsenal terapéutico y reduce la aparición de efectos secundarios significativos. Sin embargo, es necesario validar los conocimientos de la Medicina Tradicional, determinando la eficacia y la seguridad (inocuidad) de las plantas, mediante estudios científicos sistematizados<sup>2,4,13,14,15</sup>.

La investigación en plantas, así como la utilización de los recursos del medio ambiente, bajo condiciones de racionalidad: mínimo costo y alto grado de satisfacción social, se ha convertido, actualmente, en una premisa fundamental que debe ser considerada como lineamiento para orientar el desarrollo, y la incorporación, sistemática, de los conocimientos científicos y tecnológicos, a las actividades económicas, sociales y

culturales. A pesar de la gran utilización de las plantas medicinales por la población, y en forma creciente, pocas de ellas han sido estudiadas siguiendo métodos científicos válidos y atendiendo a las normas éticas, definidas internacionalmente. El consumo de la mayoría de ellas, se sustenta en el uso popular, basado únicamente en testimonios que si bien pueden ser valiosos, no significa, necesariamente, la validación del conocimiento, y no es garantía de la actividad terapéutica, más aún si consideramos que existen una serie de factores que determinan la variación de los metabolitos, aun dentro de la misma especie (variaciones ecológicas). La síntesis química de estas sustancias, es controlada por factores del ecosistema (luz, calor, temperatura, humedad y suelo) siendo importante reconocer que, muchas veces, no es posible encontrar la misma proporción relativa de esos constituyentes en las mismas especies recogidas en épocas y lugares diferentes<sup>6,7,11</sup>.

*En la Facultad de Medicina de la USMP, estamos realizando estudios, en forma sistemática, de plantas con efecto hipoglicemiante, entre las que consideramos, además del Cuti Cuti, a la Pasuchaca, al Yacón, a la Albahaca morada y otras; con rigor científico, orientados a evaluar los efectos de las diferentes plantas medicinales, considerando el uso popular de las mismas; dirigidos a investigar el tipo de metabolitos secundarios que presentan y conocer los principios activos responsables de una determinada acción farmacológica<sup>3</sup>.*

Para validar la Medicina tradicional, particularmente el uso de plantas medicinales, es indispensable determinar la eficacia y la seguridad de la sustancia. Para ello es necesario realizar los estudios de toxicidad, evaluando el riesgo/beneficio de su uso, con rigurosidad científica y siguiendo las normas éticas. La experimentación animal debe preceder a la evaluación de la planta medicinal, en la especie humana. Es preciso considerar la susceptibilidad a los fármacos, la reacción a los placebos y a la capacidad de autosugestión, para que puedan ser debidamente evaluados los efectos de una planta medicinal utilizada como medicamento. Es fácil imaginar que el tratamiento humano con una planta, sin control de calidad y sin la determinación de su actividad farmacológica, puede llevar a cualquier resultado ineficaz o hasta tóxico<sup>9,12</sup>.

El uso de la Medicina Complementaria, en los últimos años, se ha incrementado notablemente en los países desarrollados; en tanto que en los países en vías de desarrollo, se ha incrementado la Medicina Alternativa, constituyendo una valiosa contribución a la solución de problemas de Salud Pública, considerando, además, los altos precios de los medicamentos convencionales, en el mercado nacional e internacional, que los hacen inalcanzables para aquellas personas de menores recursos económicos<sup>3,7,8</sup>.

En la actualidad, proliferan cápsulas, tabletas, extractos, etc, preparados a partir de especies vegetales que se utilizan en la Medicina Tradicional. En muchos casos la colecta, identificación taxonómica de la especie, técnicas de extracción, estandarización y homogenización de los productos y pruebas farmacológicas y clínicas, son manejadas a libre albedrío.

Para obtener credibilidad en la Medicina Tradicional, la identidad de la especie vegetal es un factor importante, pues la fuerte demanda contribuye a la adulteración de las plantas medicinales. Por ello, se hace necesario desarrollar procedimientos de identificación rápida y segura, determinando marcadores químicos y biológicos que permitan identificar a la planta y garantizar el uso correcto de las mismas permitiendo la industrialización de dichas especies, y la estandarización de los productos, comparándolos con sustancias patrón o estándar a fin de determinar cualitativa y cuantitativamente la cantidad de principios activos presentes en un determinado extracto con actividad farmacológica<sup>8,9,13,15</sup>.

La Diabetes Mellitus, representa un problema de Salud Pública Mundial y es considerada como una de las enfermedades crónicas con persistencia permanente y con características de epidemia. La OMS, ha estimado que para el año 2010, Latinoamérica doblará el número de diabéticos de 12-24 millones de personas, al igual que en otras regiones en vías de desarrollo, como resultado del envejecimiento poblacional y del estilo de vida, sobre todo en las ciudades donde el ritmo de vida es mucho más activo que en el campo y, al mismo tiempo, una forma de vida sedentaria, pues poca gente dispone del tiempo suficiente para hacer ejercicio físico. Muchas enfermedades se complican por la ingestión diaria en la dieta de alimentos procesados, refinados, con bajo contenido en fibras y otros compuestos presentes en los alimentos naturales; enlatados, conservados de manera artificial durante largos períodos de tiempo, con sustancias como colorantes y saborizantes artificiales o sintéticos. Recientes datos de la OPS (Boletín Epidemiológico, Junio 2001), revelan que la incidencia de diabetes tipo I en el Perú equivale al 0.4/100000 habitantes. Así mismo, estas investigaciones le asignan al Perú, una tasa entre el 5.1% y 6% para la prevalencia de Diabetes Mellitus, en adultos. Estas mismas estadísticas, estiman que las poblaciones urbanas tienen tasas 2 veces mayores que las poblaciones rurales. El aumento de la prevalencia de diabetes, se acentúa debido a la migración progresiva de la población del campo a la ciudad y a la incorporación de hábitos que favorecen la aparición de la obesidad<sup>1,4</sup>.

En el Perú, en 1989, se logró por Resolución Ministerial, aprobar el listado de recursos terapéuticos vegetales para ser usados en los Centros Asistenciales, del antes Instituto Peruano de seguridad Social (IPSS) hoy Seguro Social de salud (EsSalud); sin embargo, no logró el impacto

necesario para su indicación por los profesionales de la salud, debido, entre otras causas, a la falta de estudios con rigor científico que sustenten la validez de su uso en la terapéutica médica. No obstante, existen algunos principios activos, aislados de las plantas, como flavonoides y alcaloides, y que se encuentran en gran proporción en Cuti Cuti, entre los cuales tenemos los flavonoides Rutina y Quercetina, que cuentan con investigaciones que confirman su efecto hipoglicemiante. La Quercetina, ejerce un efecto hipoglicemiante, al inhibir la aldosa reductasa, relacionada con la producción de polioles, responsables de los efectos crónicos de la diabetes y, por sus propiedades antioxidantes, reduce la incidencia de enfermedades cardiovasculares, incluyendo las trombosis vasculares<sup>10</sup>.

La Diabetes Mellitus, es una enfermedad crónica que puede ser controlada con dieta, hipoglicemiantes orales e insulina, por lo cual resulta importante investigar la presencia de algunos principios activos presentes en las plantas, provenientes de nuestra inmensa biodiversidad, con propiedades normalizadoras de la glicemia. La primera descripción del uso de plantas medicinales para el tratamiento de diabetes se encuentra en el papiro de Ebers, que data del año 1500 A.C (Bayley, 1989). Más de 400 plantas tradicionales han sido descritas como beneficiosas para disminuir los niveles de glicemia en pacientes diabéticos, aunque sólo en, aproximadamente, 60 de ellas se ha demostrado este efecto<sup>4</sup>.

La citotoxicidad, es un parámetro que se define como la toxicidad de cualquier molécula evaluada, sobre diversas líneas celulares, tumorales, en cultivo y proveen datos (concentración, efecto, etc) preliminares de gran valor para seleccionar las moléculas con propiedades antineoplásicas potenciales. El estudio de la acción citotóxica de cualquier sustancia, puede realizarse por diversos métodos, considerando el modelo del ciclo celular. Uno de estos métodos es el ensayo de citotoxicidad del MTT, que revela daños celulares a nivel mitocondrial. Se realiza con la línea celular transformada de mamífero, V79, fibroblastos de pulmón de Hamster chino.

En el presente trabajo, evaluamos la acción citotóxica de la *Notholaena nivea* (Cuti Cuti), con el objetivo de completar los estudios preliminares, que nos permitan realizar los estudios de fase clínica I y II, que confirmen las bondades de esta planta en el tratamiento de la diabetes mellitus, contribuyendo, así, a la mitigación o solución de los problemas de millones de personas portadoras de esta patología.





**Figura 1**  
Notholaena nivea

## **MATERIAL Y MÉTODOS:**

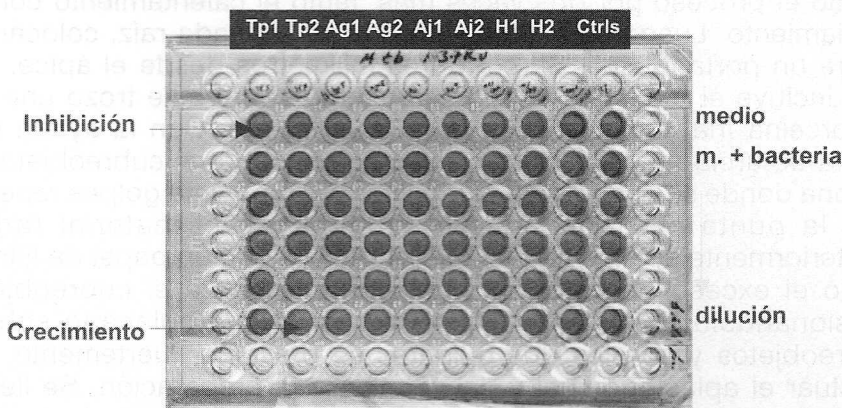
### **Material botánico:**

*Para la obtención del material biológico se solicitó la muestra al Instituto de Investigaciones Farmacéuticas Illary. Luego se preparó el extracto polar en metanol Q.P al 10% p/v y se dejó macerar por espacio de 7 días después de los cuales se eliminó en un rotavapor todo el disolvente y se obtuvo un extracto totalmente seco, el cual fue transferido a una placa petri y colocado en estufa con corriente de aire hasta obtener un residuo sólido. Para su evaluación, en el ensayo de citotoxicidad por MTT y en el ensayo en *Allium cepa* fue redisoluto con DMSO.*

Metodología de la Evaluación citotóxica. Técnica de Mosmann<sup>11</sup>, 1983.

*Esta parte del trabajo, fue realizado por la Dra. Lucy Ibáñez, en los laboratorios de la Universidad Autónoma de México. Se colocó en 96 pocillos una suspensión celular de concentración adecuada durante 4 días. Después de 48 horas de crecimiento celular a 37°C y en una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad, se añadió diversas concentraciones del extracto metabólico de Cuti-Cuti, así como el disolvente DMSO y cicloheximida a la concentración de 0.008 mg/ml. Los cultivos tratados se incubaron durante 48 horas más. Al cabo de este tiempo, los cultivos se trataron con MTT, a fin de que logre penetrar en las mitocondrias de las células viables donde es reducido por las deshidrogenasas, dando lugar a un formazán. Este formazán, al ser insoluble en el medio acuoso celular, precipita en forma de cristales de color azul. Tras 4h de incubación con MTT se procedió al vaciado de los pocillos, a la disolución de los cristales*

con DMSO y a la lectura de la absorbancia, en los pocillos, a 540 nM, que es la longitud de onda en la que el formazán presenta un máximo de absorción. Dicha absorbancia, fue medida directamente teniendo en cuenta la cantidad de células viables que quedaron tras el tratamiento con el extracto.



**Figura 2**  
Métodos de Ensayo in Vitro (Mosmann, 1983)

Método de De la Torre para la evaluación de la Actividad Antimitótica en el Modelo de Ciclo Celular de *Allium cepa*:

### Material

Raíces de bulbos de *Allium cepa*, beakers, portaobjetos, cubreobjetos, lápiz, papel de filtro, papel toalla, hoja de afeitar, pinzas finas, vidrios de reloj, goteros, microscopio, cámara fotográfica, orceína aceto-clorhídrica al 2% (55mL de ácido acético se calientan hasta ebullición, se añaden 2g de orceína y se deja hervir durante 7-10 minutos, se enfría totalmente, se añaden 55mL de agua destilada, se filtra. La solución de trabajo contiene por cada 9 partes 1 de HCl N).

Las raíces de bulbos de *Allium cepa* fueron colocadas a germinar a 25°C, a temperatura ambiente durante 3 días, tiempo suficiente para que las raíces adquirieran el tamaño necesario y pueda existir un equilibrio celular dinámico con relación al ciclo celular de proliferación. Las raíces germinadas que alcanzaron en este tiempo 2-3 cm fueron colocadas en la solución del extracto metanólico de *Notholaena nivea*, *Cuti-Cuti* a las dosis de 2, 10, 15 y 20µg/mL. Procediéndose a tomar cada 2, 4 y 6 horas,

raíces de aproximadamente un centímetro de longitud, las cuales se cortaron con ayuda de pinzas finas y se colocaron en un vidrio de reloj que contenía el colorante de orceína aceto-clorhídrica al 2%.

Con pinzas espátulazas, se sostuvieron las lunas de reloj con orceína, y las raíces sumergidas se calentaron a la llama de un mechero de alcohol hasta el inicio de la salida de vapores. Se dejó enfriar y se repitió el proceso por dos veces más, tanto el calentamiento como el enfriamiento. Luego se extrajo, con una pinza, cada raíz, colocándola sobre un portaobjetos. Se cortó tres milímetros desde el ápice, zona que incluye el meristemo, luego se añadió sobre este trozo una gota de orceína fría y se colocaron los cubreobjetos. Con la ayuda de la punta de un lápiz, se presionó, débilmente, sobre el cubreobjetos, en la zona donde se encontraba el meristemo y mediante golpes repetidos con la punta del lápiz, se fue extendiendo el material radical. Posteriormente se dejó libre el cubreobjeto y, con un papel de filtro, se retiró el exceso de colorante, colocándolo sobre el cubreobjeto y presionándolo débilmente. El mismo papel, fue colocado sobre el cubreobjetos y con los dos pulgares se presionó, fuertemente, para efectuar el aplastado final y dar término a la preparación. Se llevó al microscopio y se observaron las células en todas las fases de la mitosis y en interfase, comparando los índices mitóticos del control frente a las diferentes concentraciones del extracto de cuti-cuti.

*Los resultados, del estudio de número de células en las diferentes fases celulares, fueron analizados por el método de  $X^2$ .*

## RESULTADOS:

En la tabla N<sup>o</sup> 1, consignamos los resultados del screening fitoquímico, según la Metodología de Ciulei<sup>6,7</sup>, apreciamos la existencia predominante de: catequinas seguida de flavonoides, quinonas, fenoles, taninos, saponinas, triterpenos, lactonas, coumarinas, antocianidinas, alcaloides y principios amargos.

En las tablas N<sup>o</sup> 2 y N<sup>o</sup> 3, se consigna la lectura de la absorbancia a 540 nM, obtenida en el ensayo en MTT y en la Prueba con Óxido nítrico (NO), respectivamente; apreciamos, que el porcentaje de inhibición del desarrollo, en ambas, es de 71.72 y 14.86 %, respectivamente. En la tabla N<sup>o</sup> 4, consignamos los resultados obtenidos en la prueba de *Allium cepa* y en la tabla N<sup>o</sup> 5 los resultados del análisis estadístico, del número de células en las diferentes fases del ciclo celular, siendo altamente significativo.



**Tabla 1**  
Resultados del estudio fitoquímico de Cuti-Cuti

METABOLITOS	CUANTIFICACIÓN
Alcaloides.	+
Lactonas y coumarinas.	++
Triterpenos y/o esteroides.	++
Catequinas.	+++
Azúcares reductores.	++
Saponinas (de tipo esteroidal y triterpenoide).	++
Fenoles y taninos.	++
Quinonas.	++
Flavonoides.	++
Antocianinas.	++
Principios amargos.	+

**Tabla 02**  
ABSORVANCIA A 540 nM, POR GRUPOS Y  
NÚMERO DE LECTURAS

Nº DE LECTURAS	CUTI- CUTI (100 µM)	DMSO 60
1	0.095	0.323
2	0.097	0.332
3	0.094	0.325
4	0.097	0.328
PROMEDIO	0.09575	0.327
%GI	70.7186%	

< DO > Muerte

GI: Inhibición de desarrollo

DO: Absorvancia óptica

**Tabla 03**  
 ABSORVANCIA A 540 nm EN EL ENSAYO CON ÓXIDO NÍTRICO  
 POR GRUPOS Y NÚMERO DE LECTURAS (MACROFAGOS)

Nº DE LECTURAS	CUTI- CUTI (100 Um)	DMSO 60
1	0.190	0.227
2	0.186	0.225
3	0.192	0.226
4	0.196	0.223
5	0.195	0.227
6	0.195	0.225
PROMEDIO	0.19233	0.2255
NO	21.6381	25.415
%GI	14.8605	

NO: Óxido Nítrico

GI: Inhibición de desarrollo

**Tabla 4**  
 NÚMERO DE CÉLULAS SEGÚN CICLO CELULAR, POR GRUPOS,  
 EN *Allium cepa*

GRUPO	TIEMPO	FASES DEL CICLO CELULAR				
		Interfase	Profase	Metafase	Anafase	Telofase
<b>CONTROL</b>	2 Horas	87.99	5.96	1.91	1.28	2.82
	4 Horas	84.94	8.52	1.88	1.30	2.84
	6 Horas	72.70	23.05	1.66	0.97	1.52
Cuti- Cuti 2µg/mL	2 Horas	92.25	4.60	1.65	0.65	0.74
	4 Horas	91.23	5.39	1.10	0.75	1.5
	6 Horas	81.79	14.30	1.24	0.45	1.56
Cuti-Cuti1 10µg/mL	2 Horas	93.90	4.40	0.98	0.27	0.86
	4 Horas	91.45	5.06	1.05	0.54	1.87
	6 Horas	82.65	14.30	0.52	0.56	1.90
Cuti- Cuti 15µg/mL	2 Horas	93.00	2,67	3.50	0.25	0.57
	4 Horas	93.80	2.15	3.0	0.60	0.35
	6 Horas	83,32	15.60	0.51	0.14	0.23
Cuti- Cuti 20µg/mL	2 Horas	93.00	3.20	1.56	0.186	1.0
	4 Horas	92.00	5.4	1.2	0.36	0.97
	6 Horas	82.35	16.50	0.91	0.1	0.14

**Tabla 5**

Análisis estadístico, del número de células, en relación al control:  $X^2$ . valor de p

TIEMPO	INTERFASE	PROFASE	METAFASE	ANAFASE	TELOFASE
2H	117.47 <0.0001	51.64 < 0.0001	60.88 < 0.0001	53.53 <0.0001	90.78 <0.0001
4H	156.71 <0.0001	130.71 <0.0001	53.72 <0.0001	93.68 <0.0001	72.11 <0.0001
6 H	165.74 <0.0001	120.45 <0.0001	32.2 <0.0001	35.79 <0.0001	87,08 <0.0001

## DISCUSION.

Los ensayos de citotoxicidad, como los realizados en el presente trabajo, son ampliamente aceptados y utilizados en numerosos estudios de investigación pre clínica, debido a su simplicidad y a su confiabilidad. Existen 42 especies de helechos distribuidos en el subcontinente americano que crecen entre 500-4000 msnm. En el estudio fotoquímico, de *Notholaena nivea* utilizada en el presente trabajo (tab. N° 1), observamos la presencia mayoritaria de catequinas, llamándonos la atención la baja presencia de alcaloides, contrastando con los resultados que obtuviéramos en el estudio publicado, anteriormente, en Horizonte Médico<sup>4</sup>, donde mayoritariamente encontramos: alcaloides y esteroides. Conocemos, sin embargo, que las concentraciones de metabolitos de una planta pueden variar grandemente con factores geográficos, climáticos y calidad del suelo, es decir, con variaciones del ecosistema. Luego de analizar las células, se evidenciaron que al cabo de 6 horas de tratamiento, el índice mitótico de las células meristemáticas decreció, en relación al control, observándose el efecto citotóxico del extracto metanólico de Cuti-Cuti. Los estudios de toxicidad aguda, sub crónica y crónica, forman parte del estudio farmacológico pre-clínico, indispensable en la validación de la eficacia y seguridad (inocuidad) de las plantas, dentro de un estudio sistematizado y con rigurosidad científica, previo a los ensayos clínicos necesarios para la indicación terapéutica de las plantas. Los estudios de citotoxicidad, mutagenicidad y embriotoxicidad, forman parte de una estrategia de estudio, de la actividad antitumoral, de una serie de plantas medicinales peruanas, a igual que en otras partes del mundo. Al evaluar la citotoxicidad del Cuti cuti a la dosis utilizada según el método de Mosmann<sup>11</sup>, que determina la absorvancia, a 540 nM de longitud de onda de las células viables,

apreciamos un altísimo porcentaje de inhibición de desarrollo, reflejo de un claro efecto citotóxico, que nos permitirá, en trabajos futuros, evaluar el posible efecto de esta planta frente a patología tumoral o viral.

La evaluación de la actividad antimitótica, del Cuti Cuti, usando la técnica del ciclo celular, en *Allium cepa*, a las dosis de 2, 10, 15 y 20 microgramos por ml, nos permite apreciar una disminución de células en las fases de Profase, Metafase, Anafase y telofase, en relación a las del grupo control, aumentando notoriamente en la Interfase. La disminución es mayor en las fases posteriores del ciclo celular, lo que nos indicaría un claro efecto citotóxico del Cuti Cuti, y que deberíamos evaluar el mismo, con dosis menores. El análisis estadístico mostró que las diferencias del porcentaje celular, en las diferentes fases del ciclo celular, con su respectivo control, son altamente significativas con las cuatro dosis ensayadas.

## CONCLUSIONES

Del estudio realizado con *Notholaena nivea* podemos establecer las siguientes conclusiones:

- 1.- Los métodos de estudio in vitro, utilizados en el presente trabajo, son confiables, rápidos y de fácil implementación.
- 2.- *Notholaena nivea* presentó efecto citotóxico en el ensayo de citotoxicidad de MTT Y, efecto antimitótico, en las cuatro dosis evaluadas en *Allium cepa*.

## AGRADECIMIENTOS

A la Magíster María Teresa Ramirez de la Unidad de Pruebas Biológicas del Instituto de Química de la UNAM-México, al profesor Fernando Retuerto del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Biología de la UNMSM

## Referencias Bibliográficas

1. Asociación Latinoamericana de Diabetes. Guías ALAD, 2000, para el Control, Diagnóstico y Manejo de Diabetes Mellitus Tipo 2 con medida basada en evidencias.
2. Brack Egg, Antonio. 1999.- Diccionario Enciclopédico de Plantas Medicinales en el Perú, Cusco. Centro de Estudios Regional Andino «Bartolomé de las Casas»
3. Castañeda, B y col. 2002.- Evaluación del Efecto Antiinflamatorio del Extracto acuoso de las semillas de *Lupinus mutabilis* sweet (Tarwi, Chocho) en animales de Experimentación. Horizonte Médico USMP, vol 2 N° 1-2 Diciembre:35- 47
4. Castañeda, B; Manrique, R; Ibáñez, L. 2004.- Efecto hipoglicemiante y sobre la lipidemia de *Notholaena nivea*, «Cuti Cuti». Horizonte Médico, Junio, vol 4 N° 1: 9- 12
5. Comisión of the European Communities. Annex to Commission Directive 92/69/EEC of 31 July 1992. Adapting to technical progress for the seventeenth time Council Directive 67/548/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances. B. 1 Acute toxicity (oral). Off J Eur Comm; L 383 A) 35: 110-2.
6. CYTED. 1995 . Manual de Técnicas de Investigación. Pág. 47
7. CYTED. (2000).- Fundamentos de Tecnología de productos Fitoterapéuticos. Colombia.
8. CUBA.1993.- Ministerio de Salud Pública. Regulaciones metodológicas para la evaluación preclínica de medicamentos. La Habana. Editorial Ciencias Médicas: 3-4
9. Garcia A J.M,.M , 2001. Estudio Fitoquímico de la *Notholaena nivea* var.*nivea* . Tesis Doctoral.2001. Universidad de Salamanca-España.
10. Ibáñez V.L 2002.- Importancia de la Investigación en Plantas Medicinales. FOLIUM Año XII N°34 . Instituto de Química. UNAM – MÉXICO.
11. Mosmann, YT.(1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and citotoxicity assays. J. Inmunol. Methods. 85: 55-63
12. SouKup J.1991.- Vocabulario de los Nombres Vulgares de la Flora Peruana y Catálogo de los Géneros. Edit. Salesiana, Lima, p.290.
13. Tillán Capó, J.; Cabrera Gonzalea, Y.- 1999. Toxicidad aguda de extractos hidroalcohólicos de plantas medicinales (Cuba). Rev cubana De Plan. Med., 1(4): 26



14. Tryon R.M y R.G. Stolze. 1989.- Pteridophyte of Perú, Part II 13. Pteridaceal 15. Dennstaedtiaceal. Fieldia Botany New Series Nº 22, Field Museum of Natural History, U.S.A.
15. Vega Montalvo, R; Lagarto Parra, A. 1999.- Evaluación del efecto antiinflamatorio del extracto de Piper auritum HBK y toxicidad aguda oral (Cuba), Rev. Cubana de Plan Medic.; 1 (4): 11-14.